

# **Trabalho de Conclusão de Curso**

## **Avaliação de AgNORs em lesões cancerizáveis e carcinoma epidermóide de boca**

**Karin Berria Tomazelli**



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Curso de Graduação em Odontologia**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Karin Berria Tomazelli

**AVALIAÇÃO DE AgNORs EM LESÕES CANCERIZÁVEIS E  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito para a conclusão do Curso de  
Graduação em Odontologia  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elena Riet  
Correa Rivero  
Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo

Florianópolis

2012



Karin Berria Tomazelli

## **AVALIAÇÃO DE AgNORs EM LESÕES CANCERIZÁVEIS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 18 de setembro de 2012.

### **Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Filipe Modolo  
Co-Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico esse trabalho,

Primeiramente a Deus por ter me iluminado em todo meu caminho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional que sempre me proporcionaram e pela dedicação em fazer com que todos os meus sonhos sejam realizados.





## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero, por todos os ensinamentos que me passou. Por ter me orientado nos desafios encontrados para a realização deste trabalho, estando sempre ao meu lado para superá-los. Obrigada pelo apoio, dedicação, paciência e confiança que depositou em mim, jamais esquecerei o que aprendi com você.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira por ter me ofertado atenção quando necessário e pelo repasse de conhecimentos.

Aos professores de Patologia Geral e Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina que tiveram paciência para me tolerar todos os dias em que estive desenvolvendo este trabalho.

A colega e grande amiga, Bianca. Sua amizade foi um presente maravilhoso que eu recebi durante a caminhada da graduação. Você me incentivou e me ajudou na realização deste trabalho, e está do meu lado nas horas em que preciso. Obrigada por ter sido minha parceira todos esses dias.

As minhas colegas e amigas, que vou levar pra sempre no meu coração: Fernanda, Taise, Karoliny e Luciana. Passamos muitas coisas juntas e isso jamais será esquecido.

Agradeço muito aos meus pais Arcione e Eneve, responsáveis pela minha educação. Vocês sempre estiveram à frente dos meus sonhos, me incentivando e sendo meus aliados para que tudo desse certo, muito obrigada.

Ao meu irmão Kauê, o caçula, sempre estando presente quando precisei de seu apoio.

Ao meu amigo e namorado Marcel, que é um presente lindo que a vida me deu. Sempre me apoiando, tendo paciência e compreensão em todos os momentos que precisei estar ausente. Por ter me impulsionado nos momentos difíceis. Eu te amo.

A toda minha família, que sempre fez questão de me mostrar o orgulho que sentem da minha formação e por terem me ajudado em minha educação.

Aos meus amigos, que são essenciais na minha vida. Obrigada por terem entendido minha ausência e meu estresse nesses últimos tempos.

A todos que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)



## RESUMO

O carcinoma epidermóide (CE) é o tumor maligno mais comum que ocorre na boca. A taxa de sobrevivência para um paciente com câncer bucal é baixa, portanto um diagnóstico precoce é essencial para melhorar o quadro clínico dos pacientes com a doença. A maioria dos casos de CE se desenvolve a partir de lesões pré-malignas na mucosa bucal; estas lesões se apresentam clinicamente como leucoplasias, eritroplasias ou ainda eritroleucoplasias. As leucoplasias são lesões bucais que apresentam potencial para malignização, apresentando alterações histopatológicas que podem variar de hiperqueratose e acantose à displasia epitelial, ou até carcinoma *in situ* ou carcinoma epidermóide invasivo. Segundo o sistema binário de classificação, as displasias epiteliais (DE) podem ser determinadas como baixo grau de malignização ou alto grau de malignização; essa classificação foi criada para estabelecer um melhor tratamento de acordo com o potencial para a transformação em CE. O comportamento biológico de várias lesões e/ou tumores pode ser determinado pela proliferação celular. Para avaliar a atividade proliferativa de DE e CE presentes na mucosa oral, pode-se utilizar a técnica histoquímica dos AgNORs. O objetivo deste estudo foi avaliar o número médio de proteínas AgNORs em displasias epiteliais, CE de boca e epitélio sem displasia. Dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC foram selecionados 10 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), 11 de displasia epitelial de baixo grau (DEB), 10 de displasia epitelial de alto grau (DEA) e 11 de carcinoma epidermóide (CE). A análise quantitativa das AgNORs foi realizada em imagens microscópicas digitalizadas no aumento de 1000X, utilizando-se o software “Contando Células”. Para comparação entre os grupos foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. O número médio de AgNORs foi similar entre HFI e DEB ( $p > 0,05$ ) e entre DEA e CE ( $p > 0,05$ ). Diferença estatisticamente significativa foi observada entre a HFI e DEB com o CE ( $p < 0,05$ ), assim como entre DEB e DEA ( $p < 0,05$ ). De acordo com os resultados do estudo a contagem de AgNORs pode ser um valioso método na análise do potencial de transformação maligna das displasias epiteliais bucais.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermóide; leucoplasia; proliferação celular; AgNOR



## ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant tumor that occurs in the mouth. The survival rate for a patient with oral cancer is low, so early diagnosis is essential to improve clinical features of patients with the disease. Most SCC develops from the premalignant lesions in the oral mucosa, these lesions present clinically as leukoplakia, erythroplakias or erythroleukoplakia. Leukoplakias are oral lesions that have a potential for malignancy, showing histopathological changes that can range from hyperkeratosis and acanthosis to epithelial dysplasia, or even carcinoma in situ or invasive squamous cell carcinoma. According to the binary classification, epithelial dysplasia (ED) can be determined as low-grade or high-grade for malignancy, this classification was created to establish a better treatment according to the potential to transform into SCC. The biological behavior of various lesions and/or tumors can be determined by cell proliferation. To evaluate the proliferative activity of ED and SCC present in the oral mucosa, can be used the technique of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) quantification. The aim of this study was to evaluate the mean number of AgNORs proteins in epithelial dysplasia, oral SCC and non-dysplastic epithelium. From the Laboratory of Oral Pathology in UFSC were selected 10 cases of inflammatory fibrous hyperplasia (IFH), 11 low grade epithelial dysplasia (LD), 10 high grade dysplasia (HD) and 11 squamous cell carcinoma (SCC). The quantitative analysis of the AgNORs was performed in microscopic images and digitized at 1000x magnification, using the software "Contando Células". For comparison between groups was performed statistical test of Kruskal-Wallis. The mean number of AgNORs was similar between HFI and DEB ( $p > 0.05$ ) and between DEA and EC ( $p > 0.05$ ). A statistically significant difference was observed between HFI and DEB with CE ( $p < 0.05$ ) and between DEA and DEB ( $p < 0.05$ ). According to the study results, the AgNORs quantification can be a valuable method for the analysis of malignant transformation potential of oral epithelial dysplasia.

**Key Words:** Squamous cell carcinoma; leukoplakia; cell proliferation; AgNOR





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- **A**, coloração de AgNOR (1000X); **B**, mesma imagem após processamento da imagem com o programa “Contando Células”. ..... 44

Figura 2- **A, B e C**, revestimento epitelial de hiperplasia fibrosa inflamatória; **D, E e F**, displasia epitelial de baixo grau de malignidade; **G, H e I**, displasia epitelial de alto grau de malignidade; **J, K e L**, carcinoma epidermóide de boca. **A, D, G e J**, H&E, 100×; **B, E, H e K**, AgNOR, 100×; **C, F, I e L**, AgNOR, 400×..... 45



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores referentes à quantidade de NORs/núcleo em cada caso avaliado isoladamente e a média geral de cada grupo de HFI, DEB, DEA, CE.. .....	38
---	----



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AgNOR - Do inglês “Argyrophilic Nucleolar Organizer Region”, nome dado à técnica de impregnação das NORs pela prata.

B23 – Proteína associada às regiões organizadoras nucleolares

CE – Carcinoma epidermóide de boca

DE – Displasia epitelial

DEA – Displasia epitelial de alto risco de malignização

DEB – Displasia epitelial de baixo risco de malignização

DNA – Do inglês “Desoxyribonucleic Acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico.

Dr. - Doutor

H&E: Hematoxilina e eosina, coloração utilizada comumente para histologia.

HFI – Hiperplasia fibrosa inflamatória

LPB – Laboratório de Patologia Bucal

NOR – Do inglês “Nucleolar Organizer Region”, traduzido como regiões organizadoras nucleolares.

OMS – Organização Mundial da Saúde

Prof. - Professor

RNA – Do inglês “Ribonucleic Acid”, traduzido como ácido ribonucleico.

RNAr – Do inglês “Ribosomal ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico ribossomal

UBF – Do inglês “Upstream binding factor”, fator de transcrição dos genes ribossomais.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.2 Objetivo geral .....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.3 Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>2 ARTIGO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE A - Metodologia expandida.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE B - Ficha para a coleta de características clínicas. ....</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICE C - Ficha para classificação das lesões em grupos distintos .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE D - Ficha para tabulação dos critérios de displasia epitelial segundo o Sistema Binário de Classificação .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC.....</b>	<b>63</b>





## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

O carcinoma epidermóide (CE) é o tumor maligno mais comum que ocorre na boca, representando cerca de 90% das malignidades nessa localização (NEVILLE *et al.*, 2004). O desenvolvimento dessa neoplasia está geralmente ligado a forte prevalência dos fatores etiológicos para essa doença, representados, principalmente, pelos hábitos nocivos de consumo de fumo e álcool (SALTZ, 1988; JÚNIOR, 2006). A taxa de sobrevida para um paciente com câncer bucal não ultrapassa 50%, variando entre as diferentes etnias e faixas etárias (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; KADEMANI, 2007; OLIVEIRA; SILVA; ZUCOLOTO, 2006). Um diagnóstico precoce é essencial para um aumento dessa taxa, melhorando assim, o quadro clínico dos pacientes com a doença (BAYKUL *et al.*, 2010). A maioria dos carcinomas epidermóides se desenvolve a partir da presença de lesões potencialmente cancerizáveis na mucosa bucal. Estas lesões se apresentam clinicamente como leucoplasias, eritroplasias ou ainda eritroleucoplasias (KADEMANI, 2007).

A leucoplasia é uma denominação clínica, caracterizada por uma mancha ou placa branca da mucosa bucal, não removível à raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou microscopicamente como outra entidade patológica (KRAMER, 1978). Essas lesões geralmente apresentam aparências clínicas semelhantes, porém microscopicamente pode existir um grau considerável de heterogeneidade entre elas (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). A etiologia dessa lesão está muitas vezes ligada ao hábito do tabagismo, já que o fumo causa a liberação de substâncias irritantes, capazes de causar alterações no epitélio de revestimento da mucosa bucal (SHAFFER; HINE; LEVI, 1983).

As leucoplasias são lesões orais que apresentam grande potencial para malignização (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008). Quando essas lesões estão entremeadas com áreas avermelhadas, são denominadas de eritroleucoplasias, que demonstram geralmente um nível de displasia avançada quando submetidas ao exame microscópico (NEVILLE *et al.*, 2004).

As alterações histopatológicas das leucoplasias podem variar de hiperkeratose e acantose à displasia epitelial (DE), ou até carcinoma *in situ* ou CE invasivo (RODRIGUES *et al.*, 2000; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; NEVILLE *et al.*, 2004). Quando a displasia epitelial

está presente, indica um epitélio anormal e de crescimento desordenado (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

O grau de DE é descrito de acordo com sua intensidade e segundo a mais recente classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), as DE podem ser determinadas como leve, moderada e severa; de acordo com a presença e severidade da atipia celular e alterações no seu arranjo arquitetural; portanto, os critérios para classificação das DE segundo a OMS, são citológicos e arquiteturais. Dentre os critérios citológicos estão: o hiperchromatismo nuclear, aumento no número e tamanho dos nucléolos, presença de figuras mitóticas atípicas, aumento do tamanho dos núcleos, proporção núcleo/citoplasma alterada, variação anormal do tamanho da célula e dos núcleos, pleomorfismo celular e nuclear. Já dentre os critérios arquiteturais estão: projeções epiteliais em forma de gota, alteração da polaridade das células basais, estratificação epitelial irregular, número aumentado de figuras mitóticas, presença de mitoses superficiais anormais, presença de disceratose e pérolas de ceratina (BARNES *et al.*, 2005; KUJAN *et al.*, 2006).

Na DE leve, as modificações citológicas e arquiteturais são restritas ao terço inferior do epitélio, nas camadas basal e parabasal. Na DE moderada, as alterações estendem-se até a porção média da camada espinhosa. Na DE severa, ocorre uma atipia celular abundante com modificações que ultrapassam a porção média da camada espinhosa, ou seja, presente na maior parte da espessura epitelial. Quando toda espessura epitelial exibir atipia citológica abundante, associada a mitoses supra-basais, pode representar um carcinoma *in situ* (BARNES *et al.*, 2005; SHAFER; HINE; LEVI, 1983; NEVILLE, 2004). O carcinoma epidermóide, ainda segundo a classificação da OMS, apresenta alterações celulares e arquiteturais em toda a extensão do seu epitélio e tem como uma de suas principais características, a invasão do tecido conjuntivo adjacente (BARNES *et al.*, 2005).

Outros sistemas de classificação das DE foram criados para objetivar e diminuir os problemas de graduação, um deles é o sistema binário de classificação. Esse sistema foi criado para agrupar as lesões em menos categorias para auxiliar o clínico, e classifica as DE em alto risco de malignização (DEA) (presença de, no mínimo, quatro critérios arquiteturais e cinco critérios citológicos no epitélio) e baixo risco de malignização (DEB) (menos de quatro critérios arquiteturais e cinco critérios citológicos no epitélio) (KUJAN *et al.*, 2006).

Segundo Regezi, Ciubba e Jordan (2008), as DE podem evoluir para carcinoma invasivo. Admite-se que quanto mais grave for a alteração epitelial de uma lesão, maior será a probabilidade de

transformação maligna; por esse motivo, acredita-se que a maioria dos CE diagnosticados são precedidos de DE. Porém, é importante salientar que nem todas as DE sofrerão processo de transformação maligna e nem todas as lesões com ausência de DE estão livres de se malignizarem (VAN DER WAAL *et al.*, 1997).

O comportamento biológico de várias lesões e/ou tumores pode ser determinado pela proliferação celular, que é definida como o aumento do número de células que resultam do ciclo celular (RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993). Marcadores biológicos têm sido utilizados para avaliar a proliferação celular, um desses marcadores consiste na técnica histoquímica das AgNORs (*argyrophilic nucleolar organizer regions*) (NEVILLE *et al.*, 2004). Essa técnica consiste na detecção de proteínas específicas associadas à atividade transcricional das regiões organizadoras nucleolares (NORs), através da impregnação pela prata coloidal, sendo essas proteínas denominadas proteínas AgNORs (PLOTON *et al.*, 1986).

As NORs são segmentos de DNA, que contêm genes ribossomais os quais sintetizam as porções 18S e 28S do RNA ribossomal - RNAr (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Estas regiões correspondem a constrições secundárias dos cromossomos metafásicos de células eucarióticas, que no homem, estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 (CROCKER, 1990; UNDERWOOD; GIRI, 1988).

As NORs contêm um conjunto de proteínas ácidas, não-histônicas que se ligam a íons prata, portanto são seletivamente visualizados por métodos de marcação por prata, em amostras cito-histológicas de rotina e por esse motivo são denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares – AgNORs (HOWELL, 1982). No microscópio de luz, as NORs podem ser identificadas como pontos escuros, bem definidos, localizados por toda área nucleolar (PLOTON *et al.*, 1986).

A análise quantitativa das AgNORs pode ser utilizada para avaliação do índice de proliferação celular (TRERÈ; PASSION; DERENZINI, 1989). De acordo com Sirri, Roussel e Hernandez-Verdun (2000), as proteínas AgNORs se acumulam em células altamente proliferativas; em contrapartida, são pouco encontradas em células não-proliferativas. Também mostrou relação entre as fases do ciclo celular e a quantidade de proteínas AgNORs presente. Foi observado que na fase S ocorreu um aumento na quantidade de proteínas AgNORs, na fase G2 se manteve constante, já na fase G1 o aumento foi menor. Com isso, concluiu-se que a proliferação celular pode ser medida pela quantidade de proteínas AgNORs presente, já que na fase G1, onde ocorre o

aumento da síntese de RNAr, não há aumento na quantidade dessas proteínas (SIRRI; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUN, 2000).

Durante a atividade transcricional e a proliferação celular, as duas maiores proteínas AgNORs encontradas são a nucleolina e a proteína B23, sendo essas encontradas na fase da interfase, as quais não estão diretamente envolvidas na transcrição dos genes ribossomais. Já durante a mitose, as proteínas AgNORs são representadas pela subunidades RNA polimerase I e pelo fator de transcrição UBF, os quais são proteínas responsáveis pela maquinaria de transcrição dos genes ribossomais. O prognóstico para a proliferação de células cancerosas é baseado na quantidade das proteínas nucleolares, nucleolina e proteína B23 (SIRRI; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUN, 2000; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUN, 1994).

Alguns trabalhos encontram aplicação para as AgNORs, especialmente na histopatologia de tumores, distinguindo tumores benignos de malignos (DERENZINI, 2000). Segundo Trerè (2000) alguns estudiosos passaram a observar que células malignas geralmente mostravam grandes quantidades de proteínas AgNORs em comparação a células benignas. A avaliação das proteínas AgNORs pode ser considerada um marcador para a taxa de proliferação celular e, em lesões tumorais, pode ser usada para fins de prognóstico (DERENZINI; TRERÈ, 2001).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade proliferativa, por meio da técnica de AgNOR, em epitélio displásico, não displásico e carcinomas epidermóides de boca, a fim de verificar a utilidade desta técnica na predição do comportamento clínico das displasias epiteliais.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Efetuar um levantamento das fichas de biópsias de lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasias, eritroplasias, leucoeritroplasias e dos laudos histopatológicos de lesões diagnosticadas como carcinoma epidermóide (CE) e hiperplasia fibrosa inflamatória

(HFI), presentes nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);

- Classificar as lesões histologicamente em quatro grupos: G1: Hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) - grupo sem alteração displásica; G2: Displasia epitelial de baixo risco a malignização (DEB); G3: Displasia epitelial de alto risco a malignização (DEA); G4: Carcinoma epidermóide de boca (CE);
- Padronizar a técnica de coloração AgNOR no LPB da UFSC, para posteriores estudos nessa área;
- Avaliar a quantificação de proteínas AgNORs nas lesões em estudo;
- Estabelecer a média de AgNORs nas lesões classificadas histologicamente como HFI, DEB, DEA E CE;
- Proceder a análise estatística dos resultados em relação a média das AgNORs nos grupos em estudo.



## 2. ARTIGO

*Artigo formatado conforme normas do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (acessadas em: 28 de agosto de 2012).*

### **Avaliação de AgNORs em lesões cancerizáveis e carcinoma epidermóide de boca**

#### RESUMO

**Introdução:** O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum que ocorre na boca, sendo geralmente precedida por lesões potencialmente cancerizáveis, como a leucoplasia. Esta lesão pode variar histologicamente desde hiperkeratose, com ou sem presença de displasia epitelial, até carcinoma epidermóide invasivo.

**Objetivo:** Verificar a atividade proliferativa em displasias epiteliais (DE) de baixo e alto risco de malignização, CE e epitélio sem alteração displásica (hiperplasia fibrosa inflamatória) utilizando avaliação das proteínas AgNORs.

**Materiais e métodos:** A amostra foi dividida em 4 grupos: G1- 10 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI); G2- 11 casos de displasia epitelial de baixo risco (DEB); G3- 10 casos de displasia epitelial de alto risco (DEA) e G4- 11 casos de carcinoma epidermóide de boca (CE). A análise quantitativa das AgNORs foi realizada em fotomicrografias digitais no aumento de 1000X, utilizando-se o software “Contando células”. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação da média de AgNORs entre os grupos em estudo.

**Resultados:** A média de NORs/núcleo se mostrou significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no CE quando comparado com a HFI e com a DEB, no entanto não houve diferença estatística comparado com a DEA. Já a média da DEB mostrou-se significativamente menor em relação à DEA e CE, não havendo diferença relacionada a HFI.

**Conclusão:** A contagem de AgNORs pode ser um valioso método para auxiliar na determinação do grau das displasias epiteliais e, consequentemente, na análise do potencial de transformação maligna das mesmas.

Unitermos: Carcinoma epidermóide; Leucoplasia; Proliferação celular; AgNOR

## Evaluation of AgNORs in precancerous and oral squamous cell carcinoma

### ABSTRACT

**Introduction:** Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant tumor of the oral cavity, being preceded in most cases of pre-malignant lesions, such as oral leukoplakia. The histopathological aspect of this lesion can vary from hyperkeratosis and acanthosis to low or high epithelial dysplasia and even to SCC.

**Objective:** Investigate the proliferative activity in low and high risk of malignancy epithelial dysplasia (ED) SCC and non-dysplastic epithelium (inflammatory fibrous hyperplasia) using evaluation of AgNORs proteins.

**Methods:** The sample was divided into 4 groups: G1- 10 cases of inflammatory fibrous hyperplasia (IFH), G2- 11 cases of low risk epithelial dysplasia (LD); G3- 10 cases of high risk epithelial dysplasia (HD) and G4- 11 cases of SCC. The quantitative analysis was performed in AgNORs digital photomicrographs at 1000X magnification, using the software "contando células". The Kruskal-Wallis test was performed for comparison of the mean AgNORs counts between the study groups.

**Results:** The mean number of NORs/nucleus was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) in SCC when compared to IFH and the LD, however it was not statistically different from HD. The mean number of LD was significantly lower than the HD and SCC, with no difference related to IFH.

**Conclusion:** AgNORs quantification can be an important method to help in the determination of the degree epithelial dysplasia and, consequently, in the analysis of their malignant transformation potential.

**Key Words:** Squamous cell carcinoma; Leukoplakia; Cell proliferation, AgNOR



## INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum que ocorre na boca <sup>(16, 20)</sup>. A taxa de sobrevivência para um paciente com câncer bucal é baixa, variando entre as diferentes etnias e faixas etárias <sup>(11, 20)</sup>, portanto o diagnóstico precoce é essencial para a melhora desse quadro <sup>(2)</sup>. A maioria dos CE se desenvolve a partir da presença de lesões pré-malignas na mucosa bucal. Estas lesões podem se apresentar clinicamente como leucoplasias, eritropias ou ainda eritroleucoplasias <sup>(11)</sup>.

A leucoplasia é uma denominação clínica, para lesões caracterizadas por uma mancha ou placa branca da mucosa bucal, não removível à raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou microscopicamente como outra entidade patológica <sup>(14)</sup>. Essas lesões geralmente apresentam aparência clínica semelhante, porém microscopicamente pode existir um grau considerável de heterogeneidade entre elas <sup>(20)</sup>.

As alterações histopatológicas das leucoplasias podem variar desde hiperqueratose e acantose com ou sem displasia epitelial (DE), até carcinoma *in situ* ou CE invasivo <sup>(16, 20)</sup>. Quando a DE está presente, indica um epitélio anormal e de crescimento desordenado <sup>(20)</sup>.

A graduação das DE ainda é muito controversa e envolve grande subjetividade <sup>(9, 15)</sup>. Para objetivar e diminuir esses problemas foi criado o sistema binário de classificação, que agrupa as DE em: alto risco de malignização (DEA) e baixo risco de malignização (DEB) <sup>(15)</sup>.

Segundo Regezi *et al.* <sup>(20)</sup>, as DE podem evoluir para um CE invasivo. Admite-se que quanto mais grave for a alteração epitelial de uma lesão, maior será a probabilidade de transformação maligna, por isso acredita-se que a maioria dos CE são precedidos de DE.

Neste contexto o comportamento biológico de várias lesões e/ou tumores pode ser determinado pela proliferação celular, que é definida como o aumento do número de células que entram no ciclo celular <sup>(18)</sup>. Diversos marcadores biológicos tem sido utilizados para avaliar a proliferação celular <sup>(16)</sup> e, entre eles, a técnica histoquímica das AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer regions). Essa técnica consiste na detecção de proteínas específicas associadas à atividade transcricional das regiões organizadoras nucleolares (NORs), através da impregnação pela prata coloidal <sup>(17)</sup>.

As NORs são segmentos de DNA, que contêm genes ribossomais os quais sintetizam as porções 18S e 28S do RNA ribossomal - RNAr <sup>(10)</sup>. Estas regiões correspondem a constrições secundárias dos

cromossomos metafásicos de células eucarióticas que, no homem, estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 <sup>(4)</sup>.

As NORs contêm um conjunto de proteínas ácidas, não-histônicas que se ligam a íons prata e, portanto, são seletivamente visualizados por métodos de marcação por prata em amostras cito-histológicas de rotina, e por esse motivo são denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares – AgNORs. No microscópio de luz, as NORs podem ser identificadas como pontos escuros, bem definidos, localizados por todo o núcleo <sup>(17)</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade proliferativa, por meio da técnica de AgNOR, em epitélio displásico, não displásico e carcinomas epidermóides de boca, a fim de verificar a utilidade desta técnica na predição do comportamento clínico das displasias epiteliais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 2271.

### **Seleção dos casos e análise morfológica**

Primeiramente foi realizada uma investigação retrospectiva, por meio das fichas de biópsia, dos casos enviados para o Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cujo diagnóstico clínico foi de leucoplasia, eritroplasia ou leucoeritroplasia. Também foi feito o levantamento dos casos diagnosticados histologicamente como CE e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), por meio dos laudos histopatológicos do LPB.

A partir desse levantamento, foram selecionadas as lâminas histopatológicas dos casos coradas em hematoxilina e eosina (H&E), para avaliação em microscopia óptica e classificação em quatro grupos: Grupo 1: 10 casos de HFI – sem alteração displásica no epitélio; Grupo 2: 11 casos de DEB; Grupo 3: 10 casos de DEA e Grupo 4: 11 casos de CE. A classificação dos casos de DE foi realizada segundo o sistema binário de classificação (alto risco e baixo risco de malignização) <sup>(15)</sup>.

### **Técnica Histoquímica das AgNORs**

As amostras fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina foram submetidas a cortes de 3µm e estendidas em lâminas de vidro

previamente limpas e desgorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO USA). Primeiramente os cortes histológicos foram desparafinados em banhos de xilol e reidratados, em cadeia decrescente de etanol. A seguir os cortes foram abundantemente lavados em água deionizada e submetidos à técnica do AgNOR, de acordo com Ploton *et al.* <sup>(17)</sup> modificada por Rivero e Aguiar. <sup>(21)</sup>

Após a lavagem dos cortes por 5 minutos em água deionizada corrente estes foram submetidos a tratamento prévio com ácido cítrico 10mM pH 6.0, por 20 minutos em microondas com potência de 700W, com a intenção de melhorar a marcação pela prata. Após resfriamento, os cortes foram lavados abundantemente em água deionizada e incubadas em solução aquosa de nitrato de prata por 40 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes foram lavados com água deionizada aquecida a 45°C, deixados em água deionizada corrente em temperatura ambiente por 15 minutos, e então desidratados em concentrações crescentes de etanol, clareados com xilol e montados com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

### **Análise quantitativa das AgNORs**

A análise quantitativa das AgNORs foi realizada em fotomicrografias digitais no aumento de 1000X, por um método semi-automático, utilizando-se o software desenvolvido por Ferreira *et al.* <sup>(7)</sup> – “Contando Células”, ver figura 1. Para cada caso, foram utilizados de oito a dez diferentes campos representativos das lesões, totalizando-se no mínimo cem núcleos por caso. A seleção dos campos representativos para cada grupo foi realizada por avaliação microscópica prévia das lâminas coradas em H&E.

### **Figura 1**

### **Análise estatística**

Para comparação entre os grupos foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, a fim de verificar a diferença entre as médias de NORs/ núcleo entre os grupos estudados, sendo considerado o valor de  $p \leq 0,05$  para dados com significância estatística.

## RESULTADOS

Em todos os casos de HFI, DEB, DEA e CE avaliados, as AgNORs foram visualizadas ao microscópio de luz como pontos pretos ou acastanhados, de tamanhos distintos, forma arredonda, com limites regulares, distribuídos pelos núcleos das células epiteliais (Figura 2).

### **Figura 2**

A média de NORs/núcleo se mostrou significativamente ( $p<0,05$ ) maior no CE quando comparado com a HFI e DEB, no entanto não houve diferença estatística comparado com a DEA. Já a média da DEB mostrou-se significativamente menor em relação a DEA e CE, não havendo diferença relacionada a HFI. Esses dados estão presentes na tabela 1.

**Tabela 1 - Valores referentes à quantidade de NORs/núcleo em cada caso avaliado isoladamente e a média geral de cada grupo de HFI, DEB, DEA, CE.**

Nº DOS CASOS	GRUPOS			
	G1 - HFI (n=10)	G2 - DEB (n=11)	G3 - DEA (n=10)	G4 - CE (n=11)
1	1,76	1,57	2,22	4,15
2	1,74	1,94	2,39	3,45
3	2,37	1,85	2,2	3,35
4	1,87	1,57	3,62	2,79
5	2,23	1,81	2,69	3,68
6	2,03	1,98	3,11	3,59
7	1,79	1,93	3,34	2,82
8	2,17	1,86	2,29	3,88
9	2,02	1,7	2,47	3,44
10	1,86	1,94	2,23	2,85
11	-	2,59	-	2,66
<b>Média±DP</b>	1,98±0,21 <sup>a</sup>	1,88±0,27 <sup>b, c</sup>	2,65±0,51 <sup>b</sup>	3,33±0,49 <sup>a, c</sup>

DP: desvio padrão. Letras iguais demonstram diferença estatística entre os grupos.

## DISCUSSÃO

O CE pode se desenvolver a partir de lesões pré-malignas, como a leucoplasia que, por sua vez, pode variar histologicamente de hiperkeratose a carcinoma invasivo<sup>(16, 20)</sup>. A determinação do grau de intensidade das DE, a partir de critérios de classificação histológica, envolve um importante componente subjetivo e, portanto, é assunto controverso entre os patologistas<sup>(12, 15, 19)</sup>. Neste estudo foi utilizado o sistema binário de classificação para a graduação das DE, pois alguns estudos têm mostrado ser um método mais objetivo para essa diferenciação<sup>(15)</sup>.

A contagem de AgNORs é utilizada como marcador de proliferação celular<sup>(24)</sup> e por esse motivo tem se mostrado como uma importante ferramenta para caracterizar as DE em lesões leucoplásicas, e também o CE.<sup>(3, 19, 23, 26)</sup>

Neste trabalho encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias de contagem de DEB e DEA, confirmando que a técnica de AgNORs pode ser um importante aliado nesta distinção.

Alguns autores mostraram que o número de NORs/ núcleo se apresenta em maior quantidade nos CE do que em DE<sup>(3, 12, 19, 26)</sup>. Por outro lado, Spolidorio *et al.*<sup>(23)</sup> não encontraram diferença estatisticamente significativa na contagem de AgNORs entre as DE e o CE, apontando no entanto, distinção na morfologia das AgNORs, com base em seu tamanho, forma e padrão de distribuição no núcleo.

Foi observado, nesse estudo, que não houve diferença estatística entre o número médio de AgNORs em epitélio não displásico (que reveste a HFI) e a DEB. No entanto esses dois grupos mostraram média de AgNORs estatisticamente menor do que no CE. Outros autores já demonstraram a diferença no número médio de AgNORs em epitélio não displásico e CE<sup>(8)</sup>, o que pode ser explicado considerando que, histologicamente, a HFI apresenta somente discretas alterações epiteliais com baixa atividade proliferativa e o CE apresenta alterações em toda extensão do epitélio e células neoplásicas com intensa atividade proliferativa<sup>(6)</sup>. Da mesma forma, as DEB apresentam somente discretas alterações epiteliais com baixa atividade proliferativa, exibindo baixa contagem de AgNORs. Portanto, os dados encontrados sugerem que a quantidade de AgNORs pode ser proporcional à atividade proliferativa do epitélio, confirmando estudos prévios<sup>(5, 6, 22, 24)</sup>.

A distinção entre uma DEA e um carcinoma epidermóide em fase inicial, muitas vezes, não é possível, já que as duas apresentam células

epiteliais atípicas <sup>(1)</sup>. Segundo Warnakulasuriya <sup>(25)</sup> em muitos casos, as DEA só podem ser diferenciadas do CE pela ausência de invasão ao tecido subjacente. Além disso, Chattopadhyay *et al.* <sup>(3)</sup> sugeriu que quando a lesão se torna mais displásica e maligna, a contagem de AgNORs tende a aumentar e Xie et al <sup>(26)</sup>, mostraram que a contagem de AgNORs pode prever a progressão de uma lesão displásica a CE. Essas informações podem explicar o resultado deste estudo, com relação à ausência de diferença estatística no número médio de NORs entre a DEA e o CE.

Nossos resultados comprovam que a quantidade de AgNORs é proporcional a atividade proliferativa do epitélio <sup>(5)</sup>, já que a DEB, assim como a HFI, mostrou menor quantidade de AgNORs do que do que a DEA e o CE e, portanto, menor atividade proliferativa.

## CONCLUSÃO

A contagem de AgNORs pode ser um valioso critério para auxiliar na distinção do grau das displasias epiteliais e, portanto, na análise do potencial de transformação maligna das mesmas. Entretanto, a avaliação de AgNORs não deve ser utilizado como um método definitivo, mas sim complementar, quando existirem dúvidas a partir dos critérios histológicos.

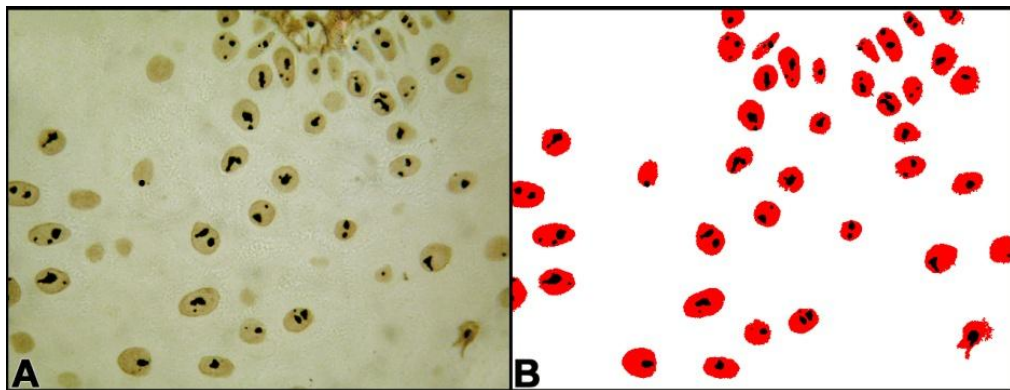
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANKLE, M. R.; KALE, A. D.; CHARANTIMATH, S. Comparison of staining of mitotic figures by haematoxylin and eosin-and crystal violet stains, in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res*, v. 18, n. 3, p. 101-5, 2007.
2. BAYKUL, T. et al. Early diagnosis of oral cancer. *J Int Med Res*, v. 38, n. 3, p. 737-749, 2010.
3. CHATTOPADHYAY, A.; CHAWDA, J. G.; DOSHI, J. J. Silver-binding nucleolar organizing regions: a study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 23, n. 6, p. 374-377, 1994.
4. CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. *Curr Top Pathol*, v. 82, n. 1, p. 92-149, 1990.
5. DERENZINI, M.; TRERE, D. Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *Pathologica*, v. 93, n. 2, p. 99-105, 2001.
6. ELANGO VAN, T.; MANI, N. J.; MALATHI, N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res*, v. 19, n. 2, p. 141-146, 2008.
7. FERREIRA, A. A. et al. An image processing software applied to oral pathology. *Pathol Res Pract*, v. 207, n. 4, p. 232-235, 2011.
8. FONSECA, L. M.; DO CARMO, M. A. AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. *Braz Dent J*, v. 11, n. 2, p. 105-110, 2000.
9. GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: BARNES, L. et al. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press, 2005. p. 177-179.
10. GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, v. 53, n. 1, p. 37-50, 1975.
11. KADEMANI, D. Oral câncer. *Mayo Clin Proc*, v. 82, n. 7, p. 878-887, 2007.
12. KARABULUT, A. et al. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 24, n. 5, p. 198-200, 1995.
13. KOBAYASHI, I. et al. The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region

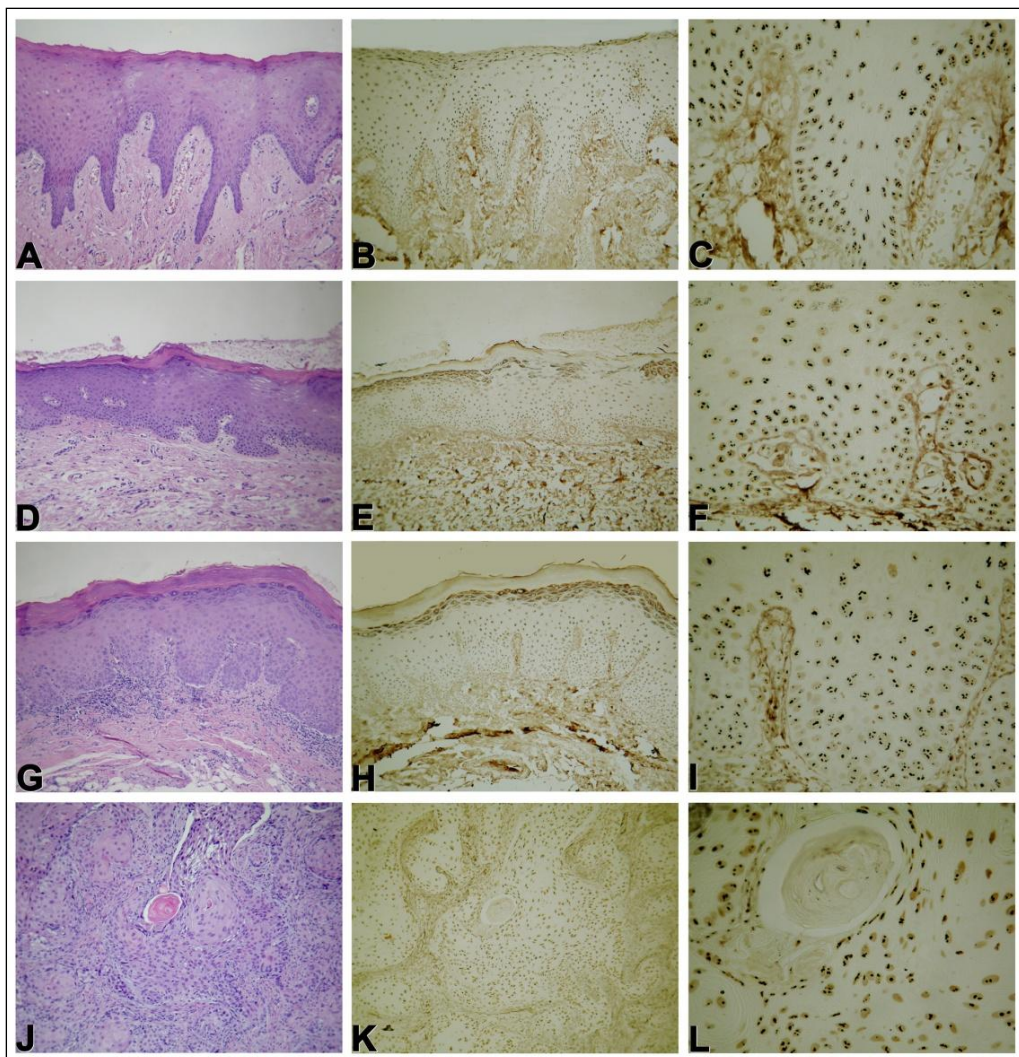
- staining. *Hum Pathol*, v. 26, n. 8, p. 907-913, 1995.
14. KRAMER, I. R. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 46, n. 4, p. 518-539, 1978.
  15. KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*, v. 42, n. 10, p. 987-993, 2006.
  16. NEVILLE, B.W et al. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
  17. PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*, v. 18, n. 1, p. 5-14, 1986.
  18. RABENHORST, S. H.; BURINI R. C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores de proliferação celular. *Rev Bras Pat Clín*, v. 29, n. 1, p. 24-29, 1993.
  19. RAY, J. G.; CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN, D. J. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*, v. 32, n. 2, p. 71-76, 2003.
  20. REGEZI, J. A.; CIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. *Patologia Oral: correlações clinicopatológicas*. 5 ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
  21. RIVERO, E. R. C.; AGUIAR M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenoide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. *J Bras Patol Med Lab*, v. 38, n. 1, p. 39-44, 2002.
  22. SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, v. 31, n. 2, p. 121-126, 2000.
  23. SPOLIDORIO, L. C. et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. *Micron*, v. 33, n. 7-8, p. 605-608, 2002.
  24. TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res*, v. 184, n. 1, p. 131-137, 1989.
  25. WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*, v. 194, n. 3, p. 294-7, 2001.
  26. XIE, X. et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous



cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, v. 79, n. 11, p. 2200-2208, 1997.



**Figura 1-** **A**, coloração de AgNOR (1000X); **B**, mesma imagem após processamento da imagem com o programa “Contando Células”.



**Figura 2-** A, B e C, revestimento epitelial de hiperplasia fibrosa inflamatória; D, E e F, displasia epitelial de baixo grau de malignidade; G, H e I, displasia epitelial de alto grau de malignidade; J, K e L, carcinoma epidermóide de boca. A, D, G e J, H&E, 100×; B, E, H e K, AgNOR, 100×; C, F, I e L, AgNOR, 400×



## REFERÊNCIAS

ANKLE, M. R.; KALE, A. D.; CHARANTIMATH, S. Comparison of staining of mitotic figures by haematoxylin and eosin-and crystal violet stains, in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Indian J Dent Res**, v. 18, n. 3, p. 101-5, jul-set. 2007.

BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 177-179.

BAYKUL, T. et al. Early diagnosis of oral cancer. **J Int Med Res**, v. 38, n. 3, p. 737-749, maio-jun. 2010.

CHATTOPADHYAY, A.; CHAWDA, J. G.; DOSHI, J. J. Silver-binding nucleolar organizing regions: a study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 23, n. 6, p. 374-377, dez. 1994.

CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. **Curr Top Pathol**, v. 82, n. 1, p. 92-149, 1990.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 117-120, apr. 2000.

DERENZINI, M.; TRERE, D. [Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNOR)]. **Pathologica**, v. 93, n. 2, p. 99-105, apr. 2001.

ELANGO VAN, T.; MANI, N. J.; MALATHI, N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment. **Indian J Dent Res**, v. 19, n. 2, p. 141-146, abr-jun. 2008.

FERREIRA, A. A. et al. An image processing software applied to oral pathology. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 4, p. 232-235, apr. 2011.

FONSECA, L. M.; DO CARMO, M. A. AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. **Braz Dent J**, v. 11, n. 2, p. 105-110, 2000.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, n. 1, p. 37-50, nov. 1975.

HOWELL, W. M. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: BUSCH H.; ROTHBLUM, L. **The cell nucleus**. New York: Academic Press, 1982. p. 89-143.

JÚNIOR, S. A. S. Etiopatogenia do câncer bucal: fatores de risco e de proteção. **SaBios-Rev. Saúde e Biol**, v. 1, n. 2, p.48-58, jul-dez., 2006. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/issue/view/2>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

KADEMANI, D. Oral câncer. **Mayo Clin Proc**, v. 82, n. 7, p. 878-887. jul. 2007.

KOBAYASHI, I. et al. The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region staining. **Hum Pathol**, v. 26, n. 8, p. 907-913, ago. 1995.

KRAMER, I. R. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 46, n. 4, p. 518-539, out. 1978.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-993, Nov. 2006.

NEVILLE, B.W et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

OLIVEIRA, L. R.; SILVA, A. R.; ZUCOLOTO, S. Z. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 385-392, out. 2006.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J**, v. 18, n. 1, p. 5-14, jan. 1986.

RABENHORST, S. H.; BURINI R. C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores de proliferação celular. **Rev Bras Pat Clín**, v. 29, n. 1, p. 24-29, 1993.

RAY, J. G.; CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN, D. J. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 2, p. 71-76, fev. 2003.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia Oral: correlações clinicopatológicas**. 5 ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

RODRIGUES, T. L. C. et al. Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológica. **Pesqui Odontol Bras**, Rio Grande do Norte, v. 14, n. 4, p. 357-361, out-dez. 2000.

ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribossomal gene activity. **Exp Cell Res**, v. 214, n. 2, p. 465-472, out. 1994.

RIVERO, E. R. C.; AGUIAR M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenoide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 39-44, jan. 2002.

SALTZ, E. Projeto de expansão da prevenção e controle do câncer de boca – Quinquênio 1988-1993. **Rev Bras Cancerol**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 221-239, 1988.

SHAFFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B.M. **Tratado de patologia bucal**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, Paris, v. 31, n. 2, p. 121-126. abr. 2000.

SPOLIDORIO, L. C. et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. **Micron**, v. 33, n. 7-8, p. 605-608, maio-ago. 2002.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 127-131, apr. 2000.

TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Exp Cell Res**, Nova Iorque, v. 184, n. 1, p. 131-137, set. 1989.

UNDERWOOD, J. C.; GIRI, D. D. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. **J Pathol**, v. 155, n. 2, p. 95-



96, jun. 1988.

VAN DER WAAL, I. et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol**, v. 33, n. 5, p. 291-301, set. 1997.

WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **J Pathol**, v. 194, n. 3, p. 294-7, jul. 2001.

XIE, X. et al. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 79, n. 11, p. 2200-2208, jun. 1997.



## **APÊNDICE A – Metodologia expandida**

### **Seleção dos casos e análise morfológica**

Primeiramente foi realizada uma investigação retrospectiva, por meio das fichas de biópsias, dos casos enviados para o Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB), cujo diagnóstico clínico foi de leucoplasia, eritroplasia ou leucoeritroplasia. Também foi feito o levantamento dos casos diagnosticados histologicamente como carcinomas epidermóides e hiperplasias fibrosas inflamatórias, por meio dos laudos histopatológicos do LPB. A partir da análise das fichas e laudos selecionados, foram coletados os seguintes dados: nº de registro, gênero, idade, tabagismo, etilismo, diagnóstico clínico, local da lesão e diagnóstico histológico segundo a ficha 1 (APÊNDICE B)

A partir desse levantamento, foram selecionadas as lâminas histopatológicas dos casos, coradas em hematoxilina e eosina (H/E), para avaliação em microscopia óptica e classificação em quatro grupos: G1: 10 casos de HFI; G2: 11 casos de DEB; G3: 10 casos de DEA; G4: 11 casos de CEO (APÊNDICE C). A classificação dos casos de DE foi realizada segundo o sistema binário de classificação (alto grau e baixo grau de malignização) (Kujan *et al.*, 2006) seguindo a ficha presente no Apêndice D. Foram excluídos do estudo as displasias epiteliais com grau intenso de inflamação no tecido conjuntivo adjacente.

Após as avaliações histopatológicas e classificação das lâminas, foram, então, selecionados os respectivos casos emblocados em parafina, para realização da técnica de AgNORs.

### **Técnica Histoquímica das AgNORs**

As amostras fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina foram submetidas a cortes de 3µm, e estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO USA). Primeiramente os cortes histológicos foram desparafinados em banhos de xilol a temperatura ambiente, sendo o primeiro *overnight*, o segundo durante 20 minutos, e o terceiro durante 5 minutos; e

reidratados, em cadeia descendente de etanol, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 80%, durante 5 minutos cada. A seguir os cortes foram abundantemente lavados em água deionizada e submetidos à técnica do AgNOR, de acordo com Ploton *et al.* (1986) modificada por Rivero e Aguiar (2002). As modificações incluíram: lavagem abundante dos cortes com água deionizada previamente à incubação com a solução de prata, realizada à temperatura ambiente por 25 minutos, omissão da celuidina, e lavagem dos cortes, após incubação, com água deionizada aquecida.

Após a lavagem dos cortes por 5 minutos em água deionizada corrente estes foram submetidos a tratamento prévio com ácido cítrico 10mM pH 6.0, com a intenção de melhorar a marcação pela prata. Este passo foi realizado colocando-se as amostras histológicas em uma cuba levada ao forno de microondas por 20 minutos, em potência máxima de 700W. O tempo de tratamento no forno foi dividido em quatro intervalos de 5 minutos cada, completando-se o tampão quando necessário. O material foi então deixado à temperatura ambiente para resfriar até conseguir o equilíbrio térmico com o ambiente. A partir daí, os cortes foram lavados em 5 banhos de água deionizada, e deixados em água deionizada corrente por 15 minutos. Depois de retirado o excesso de água das lâminas com papel absorvente, os cortes receberam a solução aquosa de nitrato de prata (a 50%) misturada à solução de gelatina (a 2% em 1% de ácido fórmico) na proporção de 2:1 e então foram incubados em câmara úmida, durante 40 minutos, à temperatura ambiente.

Após incubados, os cortes foram lavados com água deionizada aquecida a 45°C, e deixados em água deionizada corrente por 15 minutos. Finalmente os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clareados com xilol e montados com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

## **Análise quantitativa das AgNORs**

A análise quantitativa das AgNORs foi realizada em imagens microscópicas captadas por uma microcâmera e digitalizadas no aumento de 1000X, por método semi-automático, utilizando-se o software desenvolvido por Ferreira *et al.* (2011). A contagem das AgNORs pelo software é realizada com duas etapas principais: (1) Identificação e contagem de núcleos, e (2) Identificação e contagem das

AgNORs.

A identificação e contagem dos núcleos segue as seguintes etapas: (a) Segmentação dos núcleos: deve-se coletar informações sobre a cor de cada pixel do núcleo celular o que irá determinar se este será mantido ou excluído. Nesta primeira etapa, somente os pixels que pertencem ao núcleo celular devem ser mantidos. (b) Exclusão de artefatos: depois da segmentação dos núcleos, permanecem vários pixels que não pertencem a regiões dos núcleos, os quais devem ser eliminados; então, um algoritmo recursivo para a contagem dos pixels é utilizado para rejeitar os artefatos de grande escala de pixels e os de pequena escala. (c) Contagem dos núcleos: o mesmo modo utilizado para a contagem de pixels é utilizado para a contagem dos núcleos mantidos.

A identificação e contagem das AgNORs segue os mesmos passos da contagem dos núcleos, mas apresentam diferentes parâmetros. A diferença entre as duas etapas é de que, na análise AgNOR, ocorre uma extra-fase de exclusão de artefatos, caracterizada por uma operação em que ocorre a junção entre as AgNORs processadas e a imagem dos núcleos. Esse procedimento facilita a identificação de AgNORs falso-positivos, que não pertencem a nenhum núcleo. No final deste processo, apenas os núcleos com pelo menos um AgNOR são registrados (FERREIRA *et al.*, 2011).

Para cada caso foram utilizados de oito a dez diferentes campos representativos das lesões, totalizando-se no mínimo cem núcleos por caso (Figura 1).

### **Análise estatística**

Para comparação entre os grupos foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, para a verificação da diferença entre médias de NORs/ núcleo dos grupos estudados, sendo considerado o valor de  $p \leq 0,05$  para dados com significância estatística.



## APÊNDICE B – Ficha para a coleta de características clínicas.

					Nº de registro
					SEXO
					IDADE
					FUMANTE
					ETILISTA
					DIGNÓSTICO CLÍNICO
					LOCAL DA LESÃO
					DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO





**APÊNDICE C – Ficha para classificação das lesões em grupos distintos.**

<b>Nº caso</b>	<b>Hiperplasia fibrosa inflamatória</b>	<b>Displasia com baixo risco de malignização (menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações citológicas)</b>	<b>Displasia com alto risco de malignização (4 ou mais alterações arquiteturais e 5 ou mais alterações citológicas)</b>	<b>Carcinoma epidermóide</b>



**APÊNDICE D – Ficha para tabulação dos critérios de displasia  
epitelial segundo o Sistema Binário de Classificação (Kujan *et al.*,  
2006)**

		Nº DE REGISTRO					
		PB	PB	PB	PB	PB	PB
<b>ALTERAÇÕES ARQUITETURAIS</b>	<b>1.Projeções em forma de gota</b>						
	<b>2.Alteração da polaridade das células basais</b>						
	<b>3.Estratificação epitelial irregular</b>						
	<b>4.Número aumentado de figuras mitóticas</b>						
	<b>5. Mitoses superficiais anormais</b>						
	<b>6.Disceratose</b>						
	<b>7.Pérolas de ceratina</b>						
<b>ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS</b>	<b>8. Aumento do tamanho dos núcleos</b>						
	<b>9.Pleomorfismo nuclear</b>						
	<b>10.Pleomorfismo celular</b>						
	<b>11.Anisonucleose</b>						
	<b>12.Anisocitose</b>						
	<b>13.Proporção núcleo citoplasma alterada</b>						
	<b>14.Figuras mitóticas atípicas</b>						
	<b>15.Aumento do número e do tamanho dos nucléolos</b>						
	<b>16.Hipercromatismo nuclear</b>						
<b>INFL.</b>	<b>PRESENTE (x) NÃO ( )</b>						



## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CERTIFICADO** Nº 2271

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

**APROVADO**

**PROCESSO:** 2271

**FR:** 467439

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DE AGNORAS EM LESÕES CANCERIZÁVEIS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

**AUTOR:** Elena Riet Correa Rivero, Filipe Modolo Siqueira, Karim Baria Tomazelli

**FLORIANÓPOLIS,** 23 de Novembro de 2011.

Coordenador do CEPSH UFSC